

Nikotinski acetilholinski receptor kot farmakološka tarča pri pljučnem raku

Nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target in lung cancer

Veno Kononenko^{a*}, Tadeja Bele^{b,c}, Sara Novak^a, Igor Križaj^b, Damjana Drobne^a, Tom Turk^a^aBiotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija^bInstitut Jožef Stefan, Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija^cUniverza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

*Korespondenca: veno.kononenko@bf.uni-lj.si

Izvleček: Rak pljuč je zelo razširjena oblika raka z nizko stopnjo preživetja. Kajenje tobaka predstavlja glavni dejavnik tveganja za razvoj raka pljuč, saj v tobačnem dimu najdemo veliko rakotvornih snovi. Nikotin, ki sicer ni opredeljen kot rakotvoren, je glavna komponenta tobaka odgovorna za zasvojenost, poleg tega pa raziskave nakazujejo, da neodvisno od ostalih komponent tobaka v telesu sproži različne učinke, ki vplivajo na razvoj in napredovanje raka. Kot agonist nikotinskih acetilholinskih receptorjev (nAChR) nikotin spodbuja proliferacijo celic, preprečuje njihovo apoptozo, ter igra pomembno vlogo pri pospeševanju angiogeneze in zasevanju rakavih celic. Antagonisti nAChR, ki bi zavirali proliferacijo rakavih celic ter spodbujali njihovo apoptozo, predstavljajo velik terapevtski potencial. Trenutno je znanih le malo antagonistov nAChR, pri katerih je bila protirakava učinkovitost že raziskana, poleg tega pa po večini tudi niso dovolj selektivni ligandi za podvrste nAChR, ki se prekomerno izražajo v celicah pljučnega raka, zato je pričakovati škodljive stranske učinke. V izogib slednjim, se išče načine za ciljano dostavo antagonistov nAChR do rakavih celic. Precej obetajo nanodostavni sistemi, ki omogočajo prednostni vnos aktivne učinkovine v celice raka. V našem članku predstavljamo najnoveše dosežke razvoja zdravil za zdravljenje pljučnega raka na osnovi antagonistov nAChR, dostavljenih na mesto delovanja s pomočjo nanodelcev.

Ključne besede: agonist, antagonist, apoptoza, nAChR, nanodostavni sistem, nikotin, pljučni rak

Abstract: Lung cancer is a widespread form of cancer with a low survival rate. Tobacco smoking is a major risk factor for the development of lung cancer, as tobacco smoke contains many carcinogens. Nicotine, which is not classified as a carcinogen, is the main component of tobacco, responsible for addiction and recent research suggests that nicotine, independent of other tobacco components, may contribute to the development and progression of cancer. Nicotine, as an agonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), promotes cell proliferation, prevents apoptosis, and has an important role in promoting angiogenesis and metastasis of cancer cells. The realisation that nAChRs are involved in the development and progression of lung cancer has raised the idea of using nAChR antagonists that would counteract the adverse effects

of nicotine. Currently, there are only a few nAChR antagonists for which anticancer efficacy has been investigated. Many of the known antagonists do not act selectively on nAChR subtypes that are overexpressed in lung cancer cells. Nonselective nAChR antagonists can cause adverse side effects by acting on nAChR subtypes expressed on non-cancerous cells. In order to avoid such side effects, it is necessary to ensure that a given antagonist acts predominantly on cancer cells. This can be achieved by using nanodelivery systems that are preferentially uptaken by cancer cells. In this article, we present the latest achievements in the development of drugs for the treatment of lung cancer based on nAChR antagonists delivered to the site of action by nanoparticles.

Keywords: agonist, antagonist, apoptosis, lung cancer, nAChR, nanodelivery system, nicotine

Uvod

Rak pljuč spada med najpogostejše diagnosticirane oblike raka. Odgovoren je za več kot 18 % vseh z rakom povezanih smrti (Bray in sod. 2018). Za posledicami pljučnega raka na svetu letno zboli 2 milijona, umre pa 1.8 milijona ljudi (Thandra in sod. 2021). Tudi v Sloveniji imamo visoko stopnjo obolevnosti za rakom pljuč; letno zboli več kot 1400 ljudi, incidenca obolenj pa v zadnjih letih narašča (Onkološki inštitut Ljubljana 2022). Razlikujemo več histoloških oblik pljučnega raka, ki se v osnovi delijo na drobnocelični karcinom pljuč (angl. small-cell lung carcinoma oz. SCLC), ki predstavlja približno 20 % vseh rakov pljuč, in nedrobnocelični karcinom pljuč (angl. non-small-cell lung carcinoma oz. NSCLC), ki predstavlja 70-80 % vseh rakov pljuč. NSCLC lahko razdelimo na ploščatocelični karcinom (25-30 % vseh rakov pljuč), pljučni karcinom velikih celic (10-15 % vseh rakov pljuč) in adenokarcinom pljuč (približno 40 % vseh rakov pljuč), slednji je od vseh oblik pljučnega raka njegova najpogostejša oblika (Shiraishi in sod. 2012, Wang in Hu 2018).

Epidemiološke študije kažejo, da je kajenje tobaka glavni etiološki dejavnik za razvoj velike večine oblik raka pljuč (Schuller 2019), saj je odgovorno za kar 90 % vseh primerov (Thandra in sod. 2021). Tobačni dim vsebuje več kot 7000 različnih kemikalij, od katerih jih je več kot 70 s strani Mednarodne agencije za raziskave raka (International Agency for Research on Cancer – IARC) uvrščenih med rakotvorne snovi (El-Bayoumy in Stoner 2022). V tobačnem dimu najdemo številne mutagene in rakotvorne

kemikalije, kot so aldehidi, policiklični aromatski ogljikovodiki in nitrozamini (derivati nikotina) (Mao in sod. 2016). Konzumacija nikotina spet narašča zaradi vse večje popularnosti uporabe elektronskih cigaret (e-cigaret), ki jih promovirajo kot "varnejšo" alternativo klasičnim cigaretam. Pomanjkanje znanja o biomedicinskih učinkih polnilnih tekočin za e-cigarete predstavlja veliko skrb za zdravje, še posebej, ker proces segrevanja teh tekočin vodi do njihove razgradnje in nastanka novih, potencialno strupenih spojin (Marques in sod. 2021). Čeprav nikotina pogosto ne uvrščamo med rakotvorne snovi, ampak kot glavno sestavino tobaka, odgovorno za zasvojenost, pa je znano, da s svojim agonističnim delovanjem na nikotinske acetilholinske receptorje (nAChR), spodbuja proliferacijo rakavih celic, preprečuje njihovo apoptozo in pospešuje angiogenezo, s tem pa zasevanje rakavih celic (Friedman in sod. 2019). Poleg tega so nekatere raziskave pokazale, da nikotin lahko deluje genotoksično in tudi na tak način spodbuja nastanek tumorjev (Grando 2014, Sanner in Grimsrud 2015).

Čedalje boljše poznavanje biologije pljučnega raka je pripeljalo do razvoja novejših metod zdravljenja raka, kot je imunoterapija raka, pri kateri spodbudimo imunski sistem pacienta, da prepozna in uniči celice raka preko naravnih mehanizmov (Calles in sod. 2019, Doroshow in sod. 2019, Riley in sod. 2019). Kljub velikemu napredku diagnostike, genske tehnologije, operacijskih postopkov ter bioloških in kombiniranih terapij, je stopnja preživetja pri raku pljuč za obdobje petih let le okoli 10-20 % (Mao in sod. 2016). Velik problem pri zdravljenju raka pljuč

predstavlja neselektivno delovanje zdravil tudi na zdrave celice in pojav rezistence na kemoterapijo. Zaradi vloge, ki jo imajo nAChR pri razvoju in napredovanju raka pljuč, so raziskave uporabe antagonistov nAChR pri zdravljenju raka zelo aktualne. Na ta način bi radi preprečili stimulativen učinek nikotina in njemu podobnih snovi za nastanek in napredovanje pljučnega raka (Paleari in sod. 2009a, Mucchietto in sod. 2016, Mucchietto in sod. 2018). Pri uporabi antagonistov nAChR pa moramo zagotoviti, da le-ti delujejo prednostno na rakaste celice. Le tako se lahko izognemo različnim neželenim stranskim učinkom. Uporaba nanodelcev, kot nosilcev zdravilnih učinkovin, med drugim omogoča tudi ciljano dostavo sicer neselektivnih učinkovin rakavim celicam (Cho in sod. 2008, Wolfram in Ferrari 2019).

Nikotin in pljučni rak

Nikotin je naravni alkaloid, ki ga najdemo v rastlinah iz družine razhudnikovk (zlasti v tobaku), kjer služi za obrambo rastlin pred rastlinojedci, zato so ga v preteklosti uporabljali tudi kot insekticid. Pri uporabi tobačnih izdelkov se nikotin lahko absorbira v organizem skozi pljučni epitel, skozi ustne in nosne sluznice ter skozi kožo. V krvi kadilca, ki pokadi 25 cigaret na dan, je od 0,025 do 0,444 μM nikotina (Sanner in Grimsrud 2015).

Glavni učinki nikotina v telesu so posledica njegovega delovanja na holinergični sistem. Nikotin stimulira delovanje nAChR, ki so v celicah osrednjega živčnega sistema, v ganglijih avtonomnega živčnega sistema in v parasimpatičnem avtonomnem živčnem sistemu (Sanner in Grimsrud 2015). Vezava nikotina na nAChR v možganih aktivira mezolimbicni dopaminski sistem nagrajevanja, ki je odgovoren za nastanek odvisnosti in pojav odtegnitvenih simptomov (Wittenberg in sod. 2020, Picciotto in Kenny 2021).

Vloga holinergičnega sistema v živčevju je že dolgo znana, pomembno vlogo pa ima tudi v drugih organskih sistemih. Desetletja je veljalo, da so nAChR prisotni le na živčnih celicah v območju živčno-mišičnega stika, dokler niso odkrili, da se izražajo tudi v nekaterih drugih celicah, med drugim v celicah različnih oblik pljučnega raka. Schuller je leta 1989 prvič pokazal, da nAChR sodelujejo

pri regulaciji rasti tumorjev (Schuller 1989). Eno leto za tem sta Maneckjee in Minna dokazala tudi vlogo nAChR v regulaciji apoptoze (Maneckjee in Minna 1990). Sledila je demonstracija izražanja teh receptorjev v številnih tkivih sesalcev (Wessler in Kirkpatrick 2008), ter njihove vključenosti v uravnavanje celične proliferacije, migracije in diferenciacije (Grando 2014). Številne *in vitro* ter *in vivo* raziskave, kakor tudi asociacijske študije na ravni celotnega genoma (angl. Genome-Wide Association Studies; GWAS), so pokazale na pomembno vlogo holinergične signalizacije pri razvoju in napredovanju raka pljuč. Celice pljučnega raka izražajo proteine, ki so potrebni za privzem holina, za sintezo, transport in razgradnjo acetilholina (ACh) (Friedman in sod. 2019). Izražajo pa tudi receptorje, katerih ligand je ACh: ionotropne nAChR in metabotropne muskarinske acetilholinske receptorje (mAChR). Od vseh komponent holinergične signalizacije se je največ dosedanjih raziskav povezanih z rakom pljuč usmerilo v preučevanje nAChR in z nAChR-povezanih signalnih poti, saj je znano, da so različni podtipi nAChR povezani s tveganjem za razvoj in napredovanje te bolezni.

Vpliv nikotina na nAChR

Raziskave so pokazale, da ima nikotin pomembno vlogo pri spodbujanju proliferacije celic pljučnega raka, pri pospeševanju angiogeneze in zasevanju rakavih celic. Preko delovanja na nAChR ščiti celice raka pljuč pred celično smrtjo (apoptozo), ki jo povzročajo kemoterapevtiki, ionizirajoče sevanje in oksidativni stres (Friedman in sod. 2019).

nAChR so ionotropni receptorji na celičnih membranah. Sestavlja jih pet podenot, ki so lahko α (izooblike 1-10), β (izooblike 1-4), γ , δ ali ϵ . Poznamo homopentamerne nAChR, npr. $\alpha 7$ -nAChR, ki ga sestavlja pet identičnih $\alpha 7$ podenot, ali pa heteropentamerne receptorje, npr. $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, ki ga sestavljata dve $\alpha 4$ in tri $\beta 2$ podenote. Različni podtipi nAChR različno prepuščajo katione, Na^+ , K^+ ali Ca^{2+} , in regulirajo različne procese, tudi v odvisnosti od tipa celic, v katerih se nahajajo (Schuller 2009). Vezava agonista, npr. fiziološkega nevrottransmiterja ACh,

na nAChR izzove konformacijske spremembe receptorja, te pa omogočijo tok kationov skozi celično membrano (Hurst in sod. 2013). Poleg ACh, ki je endogeni agonist nAChR in deluje kot avtokrini ali parakrini rastni dejavnik pljučnih epitelnih celic, kakor tudi celic raka pljuč, aktivira nAChR tudi eksogeni nikotin in njegovi derivati (NNK: 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon in NNN: N'-nitrozornikotin), ki nastajajo ob gorenju tobaka.

V celicah SCLC so najbolj izraženi homopentamerni $\alpha 7$ -nAChR, ki selektivno prepuščajo Ca^{2+} ione (Chen in sod. 2019), v celicah NSCLC pa poleg $\alpha 7$ -nAChR zasledimo tudi različne heteropentamerne nAChR (Schuller 2009). Vstop kationov v celico, zaradi vezave agonista na nAChR, zmanjša negativni potencial v notranjosti celice, kar pomeni depolarizacijo membrane, ta pa povzroči odprtje membranskih napetostno-odvisnih Ca^{2+} kanalčkov in še dodatni dotok Ca^{2+} v celico. Dvig znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} ionov ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sproži različne signalne poti, vključene v regulacijo celične proliferacije, apoptoze, migracije in diferenciacije (Sl. 1).

Za razliko od večine celičnih receptorjev, katerih izražanje se ob kronični izpostavitvi agonistu zmanjša, se izražanje nAChR ob kronični izpostavitvi nikotinu poveča (Schuller 2009). To poveča stimulacijo celic, tako z eksogenim nikotinom, kot z endogenim ACh, torej z avtokrino in parakrino zanko (Grando 2014). Ob kronični izpostavitvi celic nikotinu pride v centralnem živčevju (predvsem v delu možganov, imenovanem *nucleus accumbens*) do reverzibilne desenzitizacije $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, medtem ko občutljivost $\alpha 7$ -nAChR ostane nespremenjena (Kawai in Berg 2001). Pri kadičih se tako poveča izražanje bioloških funkcij $\alpha 7$ -nAChR, medtem ko se izražanje funkcij $\alpha 4\beta 2$ -nAChR zmanjša. Ker so $\alpha 7$ -nAChR vključeni v stimulacijo celic raka, $\alpha 4\beta 2$ -nAChR pa tudi v njihovo inhibicijo (Schuller 2009), se tako ustvarijo ugodne razmere za razvoj in napredovanje rakaste tvorbe. Pri celicah SCLC pride do povečanega izražanja ter do senzitizacije $\alpha 7$ -nAChR tudi v hipoksičnem okolju (Schuller 2007), kar je eden izmed možnih vzrokov za visoko pojavnost raka pljuč pri bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (Carr in sod. 2018). Tako $\alpha 7$ -nAChR kot tudi $\alpha 4\beta 2$ -nAChR stimulirata izločanje dopamina,

ki ima poleg vloge ekscitatornega živčnega prenašalca v možganih tudi stimulativen učinek na proliferacijo celic nekaterih oblik raka, npr. raka prostate in raka dojke. Oba receptorja stimulirata izločanje stresnih živčnih hormonov (adrenalin, noradrenalin), ki prispevajo k razvoju številnih vrst raka, tudi pljučnega adenokarcinoma (Schuller 2009). $\alpha 7$ -nAChR stimulira tudi izločanje serotonina in neuropeptida bombesina, oba rastna dejavnika SCLC (Cattaneo in sod. 1993, Jull in sod. 2001, Schuller 2009). $\alpha 4\beta 2$ -nAChR stimulira izločanje γ -aminomaslene kisline (GABA), inhibitornega nevrottransmiterja, ki deluje kot zaviralec adenokarcinoma pljuč (Schuller in sod. 2008).

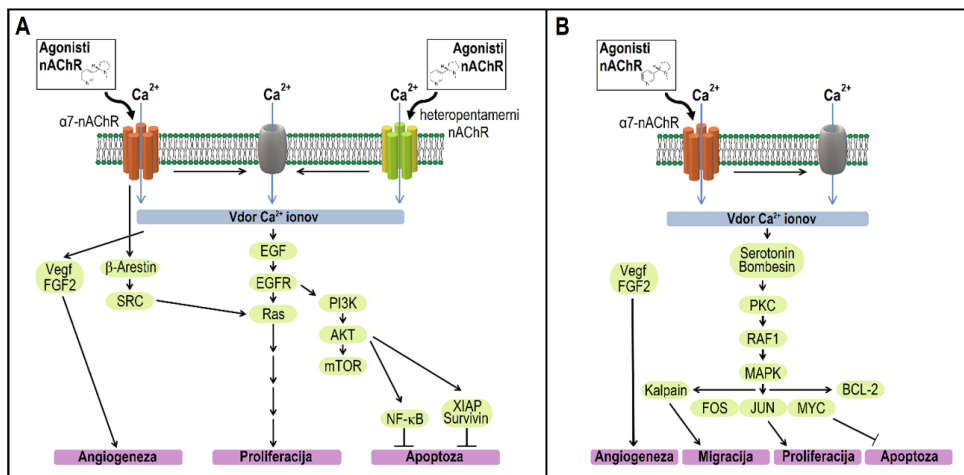
Pri celicah SCLC so signalne poti regulirane zlasti preko $\alpha 7$ -nAChR (Schuller 2009; Sl. 1A). Vezava agonista na $\alpha 7$ -nAChR sproži vdor Ca^{2+} ionov v celico skozi $\alpha 7$ -nAChR. Ta učinek se še ojača s posledičnim odprtjem napetostno-odvisnih Ca^{2+} kanalčkov. Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sproži izločanje avtokrinih rastnih dejavnikov serotonina in bombesina, kot tudi dejavnikov angiogeneze (VEGF - vaskularni endotelni rastni dejavnik; in FGF2 - fibroblastni rastni dejavnik 2). Serotonin in bombesin aktivirata signalno kaskado preko protein kinaze C (PKC), serin/treonin kinaze RAF1, z mitogenom aktiviranih protein kinaz (MAPK), regulatorja apoptoze BCL-2 ter transkripcijskih faktorjev FOS, JUN in MYC, kar privede do stimulacije proliferacije in inhibicije apoptoze. Od MAPK-odvisna fosforilacija kalpainov, s Ca^{2+} -reguliranih proteinaz, stimulira migracijo celic SCLC.

Pri celicah NSCLC je signalizacija povezana tako s homopentamernimi kot heteropentamernimi nAChR (Schuller 2009; Sl. 1B), razen pri kadičih, kjer so signalne poti regulirane predvsem preko homopentamernih $\alpha 7$ -nAChR, saj so heteropentamerni nAChR desenzitizirani. Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sproži sproščanje dejavnikov angiogeneze, VEGF in FGF2. Vstop Ca^{2+} v celico sproži sproščanje epidermalnega ravnega dejavnika, EGF, in aktivacijo signalne poti preko njegovega receptorja (EGFR). $\alpha 7$ -nAChR preko od β -arrestin-odvisnega proto-onkogene SRC, aktivirajo regulatorni protein Ras, ki okrepi signalno pot EGFR, ta pa je ena izmed najpomembnejših poti regulacije rasti, proliferacije, preživetja in diferenciacije celic. EGFR aktivira signalno pot Akt in njene efektorje,

inhibitorje apoptoze (XIAP in survivin), in jedrni faktor- κ B (NF- κ B).

Nedavne raziskave so pokazale, da pljučne celice ne izražajo nAChR le na zunanji celični membrani (plazmalemi), ampak izražajo funkcionalne nAChR tudi na zunanji membrani mitohondrijev (Friedman in sod. 2019). Izražanje mitohondrijskih nAChR je v celicah pljučnega raka povečano

(Chernyavsky in sod. 2015). Aktivacija $\alpha 7$ -nAChR v mitohondriju prepreči odprtje prehodnih por v mitohondrijski membrani (angl. mitochondrial permeability transition pore; mPTP), s tem pa sproščanje citokroma c in iniciacijo apoptoze celice (Grando 2014, Chernyavsky in sod. 2015, Skok in sod. 2016).



Slika 1: Signalne poti, ki jih sprožijo agonisti nAChR pri celicah drobnoceličnega karcinoma pljuč (SCLC) (A) in celicah nedrobnoceličnega karcinoma pljuč (NSCLC) (B). Vezava agonista na nAChR sproži vstop Ca^{2+} ionov v celico in signalno kaskado, ki vodi v povečano proliferacijo in migracijo celic, zmanjšano apoptozo celic ter v pospešeno angiogenezo. Okrajšave: AKT, AKT serin/treonin kinaza; BCL-2, B-celični CLL/limfoma 2 regulator apoptoze; EGF, epidermalni rastni dejavnik; SRC, SRC proto-onkogen, ne-receptorska tirozin kinaza; EGFR, receptor epidermalnega rastnega dejavnika; FGF2, fibroblastni rastni dejavnik 2; FOS, transkripcijski faktor FOS; JUN, transkripcijski faktor JUN; MAPK, z mitogenom aktivirane protein kinaze; mTOR, tarča rapamicina pri sesalcih; MYC, transkripcijski faktor MYC; NF- κ B, jedrni faktor- κ B; PI3K, fosfoinozolid-3-kinaza; PKC, protein kinaza C; RAF1, Raf-1 proto-onkogen, serin/treonin kinaza; RAS, majhna regulatorna GTPaza; VEGF, vaskularni endotelni rastni dejavnik; XIAP, X-vezani inhibitor apoptoze. Slika je povzeta po Schuller (2009).

Figure 1: Signaling pathway triggered by nAChRs agonists in small-cell lung cancer cells (SCLC) (A) and non-small-cell lung cancer cells (NSCLC) (B). Agonist binding to nAChRs causes an Ca^{2+} influx and signal cascade leading to increased proliferation and migration of apoptosis and stimulated angiogenesis. Abbreviations: AKT, AKT serine/threonine kinase; BCL-2, B-cell lymphoma 2 apoptosis regulator; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; FGF2, fibroblast growth factor 2; FOS, transcription factor FOS; JUN, transcription factor JUN; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; MYC, transcription factor MYC; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; PKC, protein kinase C; RAF1, raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase; RAS, small regulatory GTPase; SRC, SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis. The Figure is adapted according to original from Schuller (2009).

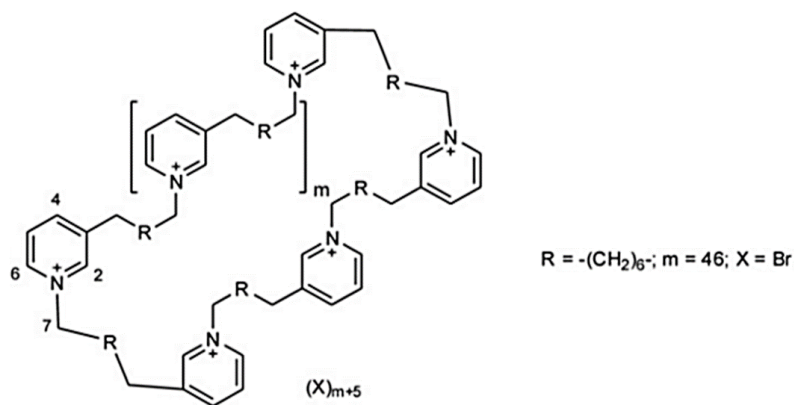
Antagonisti nAChR

Antagonisti nAChR z vezavo na receptor zmanjšajo ali celo preprečijo učinke agonista, npr. nikotina. Dasgupta in sod. (2006) so pokazali, da 1 μ M koncentracija nikotina zavre apoptozo, ki jo sproži kemoterapevtik cisplatin, ta učinek pa je mogoče izničiti z uporabo heksametonijevega bromida, antagonista nAChR (Dasgupta in sod. 2006). Antagonisti so lahko kompetitivni, kar pomeni, da z agonisti tekmujejo za isto vezavno mesto na receptorju, lahko pa so nekompetitivni in se vežejo neke drugje na receptorju ter posredno otežijo vezavo agonista na receptor (Hurst in sod. 2013). Večina naravnih antagonistov nAChR je nekompetitivnih in z vezavo na nAChR povežejo sosednji receptorski podenoti med seboj, ter tako preprečijo konformacijske spremembe receptorja, ki so potrebne za odprtje ionske pore (Samson in Levitt 2008). Nekateri nekompetitivni antagonisti se pri visokih koncentracijah vežejo tudi na mesto znotraj ionske pore in s tem fizično preprečijo prehajanje kationov (Liu in sod. 2008).

V preteklih raziskavah so se antagonisti, predvsem kompetitivni α -bungarotoksin in njegovi radioaktivni in fluorescenčni derivati, uporabljali za označevanje nAChR in kot molekularno orodje za preučevanje signalnih poti, povezanih z nAChR. V veliko pomoč so bili tudi pri strukturnih raziskavah, npr. za določitev aminokislinskih ostankov v nAChR, pomembnih za selektivno vezavo ligandov (Zhu in sod. 2020). Manj je znanja o tem, s katerimi signalnimi potmi je povezana vezava antagonistov na nAChR, to pa bi lahko bilo ključnega pomena za zdravljenje raka. Raziskave so nakazale, da bi se na ta način lahko sprožila celična apoptoza (Zovko in sod. 2013, Berne in sod. 2018).

Večina znanih naravnih antagonistov nAChR so toksini, npr. rastlinska toksina metililkakonitin in D-tubokurarin, in živalski toksini. Slednje so našli v kačjih strupih, npr. triprsta nevrotoksina, α -bungarotoksin in α -kobratoksin, ter sekretorne fosfolipaze A₂, kot vurtoksin. V strupih morskih polžev iz rodu *Conus* so t.i. konotoksini in primera dveh antagonistov nAChR sta ArIB in RgIA.

Antagoniste nAChR najdemo tudi v algah. Iz enoceličnih dinoflagelatnih alg so tako izolirali fitotoksine s tako aktivnostjo, gimnodimine in spirolide (Wintersteiner in Dutcher 1943, Jennings in sod. 1986, Hu in sod. 2001, Haywood in sod. 2004, Whiteaker in sod. 2007, Utkin 2013, Vulvius in sod. 2014, Ren in sod. 2019). Omenjeni toksini za zdravljenje raka niso neposredno uporabni, saj bi zaradi preferenčne vezave na mišične nAChR v motoričnih sinapsah povzročili vrsto resnih neželenih (toksičnih) učinkov (Grozio in sod. 2008, Paleari in sod. 2009a, Paleari in sod. 2009b). Manj toksični antagonisti nAChR so zato dobrodošli. Taki so npr. cembranoidi, naravni diterpeni, izolirani iz koral, ki so že pokazali protirakavo delovanje (Ferchmin in sod. 2009). Precej raziskav poskuša z usmerjenim spreminjanjem strukture konotoksinov pripraviti mutante z večjo selektivnostjo vezave na podvrste nAChR, ki pomembno sodelujejo pri razvoju raka (Whiteaker in sod. 2007). Iz morske spužve *Reniera sarai* so že pred časom izolirali alkilpiridinijeve polimere (poli-APS), ki bi bili lahko uporabni za zdravljenje raka z antagonisti nAChR (Sepčić in sod. 1997, Turk in sod. 2007, Turk in sod. 2008). Uspeli so tudi s pripravo nekaterih sintetičnih analogov APS (Koss in sod. 2007, Houssen in sod. 2010) in pokazali, da je polimerna (1,3-oktilpiridinijeva) sol, APS8 (Sl. 2), močan nekompetitivni antagonist α 7-nAChR. Delovanje α 7 oblike receptorja blokira že pri koncentraciji 1-3 nM, precej manj učinkovit pa je na α 4 β 2-nAChR. Dosedanje raziskave so pokazale, da APS8 pomembno zmanjša anti-apoptotske učinke nikotina na celice pljučnega adenokarcinoma (A549). Vezava APS8 na α 7-nAChR sproži signalne poti, ki vodijo v apoptozo in hkrati zavre anti-apoptotske signale (Zovko in sod. 2013). APS8 so testirali tudi *in vivo* na ksenograftih humanega pljučnega adenokarcinoma na imunsko zavrtih miših (SCID). Medtem, ko je intratumorski vnos APS8 učinkovito zavrl rast tumorja (Berne in sod. 2018), pa je bilo zdravljenje s sistemskim intravenoznim vnosom manj učinkovito. Za nadaljnji razvoj v smeri tarčnega vnosa APS8 v rakave celice je pomembno, da toksičnih učinkov APS8 pri miškah ni bilo opaziti (Berne in sod. 2018).



Slika 2: Kemijska struktura polimerne različice 1,3-oktilpiridinijske soli (APS8).

Figure 2: Chemical structure of 1,3-octylpyridinium salt (APS8).

Kljub nekaterim spodbudnim rezultatom je razumevanje vpliva antagonistov nAChR na celice in signalne poti, ki jih sprožijo ob vezavi na nAChR, še zelo omejeno. Poleg napredka v razumevanju molekularnega mehanizma delovanja antagonistov nAChR na celice, pa se veliko pozornosti posveča tudi zmanjševanju verjetnosti pojava stranskih učinkov zaradi delovanja na netarčne celice. Velik potencial na tem področju ima uporaba nanodelcev kot nanodostavnih sistemov.

Nanodostavni sistemi

Konvencionalni kemoterapevtiki se v telesu porazdelijo nespecifično, tako da vplivajo na rakave kot tudi na nerakave celice (Cho in sod. 2008). Velik izziv pri zdravljenju raka je vnos zdravilne učinkovine na način, da bi ta v zadostni koncentraciji dosegla želeno lokacijo, obenem pa ne delovala na sosedna tkiva in s tem povzročala neželene stranske učinke. Uporaba nanodelcev za ciljno dostavo zdravilnih učinkovin predstavlja obetaven pristop.

Nanodelci so vsi delci, ki imajo eno ali več dimenzij v velikostnem območju med 1 in 100 nm. Imajo posebne transportne, biološke, optične, magnetne, elektronske in termične lastnosti, drugačne od tistih na molekularnem kot tudi na makro nivoju. Z razvojem nanotehnologije se povečujejo

možnosti načrtne priprave nanodelcev z želenimi lastnostmi, ki jih lahko uporabimo v medicini za diagnostiko, spremljanje bolezni ter njihovo zdravljenje (Murthy 2007). Nanodelce lahko uporabljamo tudi kot modulatorje imunskega odziva (Kononenko in sod. 2015). Pri zdravljenju rakavih obolenj lahko uporabimo magnetne nanodelce, s pomočjo katerih tumor uničujemo s segrevanjem - hipertermijo (Sadhukha in sod. 2013, Kononenko in sod. 2017a). V Evropi je že dovoljena uporaba zdravljenja možganskih tumorjev z nanodelci železovega oksida (NanoTherm), ki jih preko lokalne infuzije vnesemo na območje tumorja in nato izpostavimo izmeničnemu magnetnemu polju, ki sproži ablacijo tumorja s segrevanjem. Možna je tudi uporaba fotoreaktivnih nanodelcev, ki pri fotodinamični terapiji (ang. photodynamic therapy, PDT) prenesejo svetlobno energijo na kisik, s čimer nastanejo reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species, ROS), ki delujejo fototoksično za rakave celice (Lucky in sod. 2015, Imani in sod. 2017, Kononenko in sod. 2017b). Enega izmed najbolj obetajočih produktov nanotehnologije pri zdravljenju rakavih obolenj pa predstavljajo nanodelci, ki jih lahko uporabimo za ciljno dostavo učinkovine. Z nanodostavnimi sistemi tako odpravljamo težavi slabe topnosti terapevtske učinkovine in nizke specifičnosti delovanja ter posledične sistemske toksičnosti. Za dostavo zdravil lahko uporabimo različne tipe

nanodelcev, kot so liposomi, miceli, dendrimeri, polimerni nanodelci, virusni nanodelci, proteinski nanodelci, porozni nanodelci in kovinski nanodelci (Doroudian in sod. 2021).

Velikost nanodostavnega sistema omogoča vgradnjo več aktivnih in pomožnih komponent v isti nanodelec (Wolfram in Ferrari 2019). Posamezne komponente je mogoče načrtno oblikovati tako, da v čim večji meri prispevajo k učinkovitosti in varnosti zdravljenja. Pomožne komponente lahko služijo za izboljšanje topnosti aktivne komponente, kot zaščita pred njeno razgradnjo, kot pomoč pri kontroliranem in podaljšanem sproščanju v tumorskem mikrookolju, omogočajo pa tudi boljši prodor v tkiva in čez bariere, izogibanje imunskemu sistemu, izboljšajo specifičnost delovanja, služijo pa lahko tudi za označevanje rakavega tkiva na zajetih slikah (Blanco in sod. 2015, Wolfram in Ferrari 2019).

Konvencionalna zdravila so pogosto manjša od 1 nm in ko prispejo v krvnožilni sistem se lahko porazdelijo po večini tkiv v telesu, relativno neodvisno od lokacijsko specifičnih lastnosti žilnega sistema. Difuzija omogoča prodor učinkovine do rakavih celic, hkrati pa proдре učinkovina tudi do zdravih celic, kar omejuje količino uporabljene doze, da se ne izzove preveč neželenih stranskih učinkov. Transport in porazdelitev sistemsko apliciranih nanodelcev v telesu sta bolj odvisna od lastnosti žilja. Tako lahko pri uporabi nanodostavnih sistemov izkoristimo posebnosti žil, ki oskrbujejo tumorsko tkivo (Wolfram in Ferrari 2019). Lastnosti teh žil se močno razlikujejo od zdravih žil, saj je angiogeneza okoli hitro rastočega tumorskega tkiva zelo hitra, kar privede do prepleta krvnih žil s številnimi nepravilnostmi endotelija (Siemann 2011). Različne raziskave so pokazale, da se sistemsko aplicirani nanodelci v telesu kopičijo v tumorjih, kar se največkrat pripisuje učinku zadrževanja učinkovine na mestu tumorja zaradi pasivnega ciljanja (angl. enhanced permeability and retention effect, EPR). Učinek EPR je rezultat poškodovanosti krvnih žil, ki oskrbujejo tumorje, s tem pa njihove večje prepustnosti za nanodelce. Obenem je v tumorskem tkivu oslabiljena limfna drenaža, kar podaljša zadrževalni čas nanodelcev (Wolfram in Ferrari 2019). Stopnja endocitoze je v rakavih celicah glede na zdrave pogosto večja, kar lahko izkoristimo za usmerjeno internalizacijo

nanodelcev, polnih učinkovine, v rakave celice. To tudi prispeva k manjši toksičnosti učinkovine za normalne celice (Cho in sod. 2008, Ye in sod. 2018).

Nanodelci kot nosilci omogočajo tudi vnos zdravila na enostaven, učinkovit in neinvaziven način skozi pljuča, kar je zlasti primerno pri zdravljenju bolezni kot je pljučni rak (Paranjpe in Müller-Goymann 2014). Tako dosežemo lokalno dostavo in povečamo učinkovitost zdravila na želeni lokaciji (Shen in Minko 2020). Vnos nanodelcev z inhalacijo (pulmonalni vnos) predstavlja učinkovito alternativo drugim načinom vnosa. Pljuča predstavljajo veliko površino za vnos nanodelcev z zdravilom, ob katerem se le-to ne razgradi ali biotransformira, kot bi se lahko v prebavnem traktu oziroma v jetrih (Sadhukha in sod. 2013). Kot nosilci zdravil za inhalacijo se največkrat omenjajo različni biokompatibilni in biorazgradljivi nanodelci, kot so lipidni nanodelci (trdni lipidni nanodelci in liposomi) in polimerni nanodelci, sestavljeni iz polilaktične kisline (PLA), polilaktične-ko-glikolne kisline (PLGA), polikaprolaktona (PCL), alginata, hitozana in želatine (Paranjpe in Müller-Goymann 2014). Preučuje se tudi uporaba anorganskih nanodelcev za inhalacijo, ki imajo različne zelene lastnosti (npr. magnetne, kontrastne, radiosenzibilne lastnosti). Povzročajo lahko tudi stranske učinke na pljučnem tkivu (npr. zaradi sprožitve oksidativnega stresa), ki pa se lahko kontrolirajo preko prilagajanja časa izpostavitve in doze (Anderson in sod. 2020).

Nanodostavna zdravila so v klinični uporabi za zdravljenje raka že skoraj 30 let. Leta 1995 je Doxil, kemoterapevtik doksorubicin v liposomu za zdravljenje Kaposijevega sarkoma, raka jajčnikov in različnih oblik mieloma, postalo prvo nanodostavno zdravilo, odobreno s strani ameriške Uprave za hrano in zdravila (Food and Drug Administration, FDA). Leta 2005 je FDA odobrila še eno zdravilo proti raku na bazi nanodelcev – Abraxane. To vsebuje kemoterapevtik paklitaksel, vezan na albuminske nanodelce. Sprva je bil Abraxane odobren le za zdravljenje raka dojke, zaradi dobrih rezultatov, pa je FDA leta 2012 odobrila njegovo uporabo tudi za zdravljenje pacientov z NSCLC. Čeprav je trenutno odobrenih še več nanoterapevtikov (Anselmo in Mitragotri 2019), pa je potencial nanotehnologije v medicini še vedno slabo izkoriščen.

Zaključek in pogled v prihodnost

Kljub vse boljšemu poznavanju patofiziologije rakavih obolenj, so te bolezni še vedno med glavnimi problemi in izzivi svetovnega zdravstva. Raziskave o vlogi nikotina pri razvoju pljučnega raka niso pomembne le za boljše razumevanje te bolezni pri kadilcih, ampak tudi za boljše razumevanje varnosti uporabe nikotinskih izdelkov brez tobaka, katerih uporaba se povečuje (npr. e-cigarete in izdelki, ki se uporabljajo pri nadomestnem zdravljenju z nikotinom).

Raziskave nAChR na celicah pljučnega raka nakazujejo, da ima nikotin pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju bolezni. Ta spoznanja so pomembno vplivala na raziskave terapevtskega potenciala antagonistov nAChR za preprečevanje stimulativne vloge nikotina in drugih, tudi endogenih, agonistov nAChR pri razvoju raka.

Uporaba nanodostavnih sistemov, ki bi selektivno prenesli antagoniste nAChR oziroma kemoterapevte do rakavih celic v pljučih, bi lahko bistveno zmanjšala pomanjkljivosti zdravljenja s konvencionalnimi kemoterapevtiki, predvsem pojav resnih stranskih učinkov. Raziskave, ki prinašajo nova znanja o molekularnih mehanizmi razvoja in poteh napredovanja raka pljuč, študije o snoveh, ki te procese zavirajo ter testiranje novih sistemov za dostavo zdravil, so ključnega pomena za razvoj novih pristopov zdravljenja te kompleksne bolezni.

Summary

Lung cancer is one of the most commonly diagnosed cancers in the world and is responsible for a large proportion of cancer related deaths. Tobacco smoking is the most important etiological factor for the development of all histological forms of lung cancer, because many carcinogenic chemicals are present in tobacco smoke. Nicotine is a component of tobacco smoke that is responsible for addiction, and although it is commonly not considered as a carcinogen, it can trigger a number of cancer-promoting effects. In addition to acetylcholine (ACh), which is an endogenous agonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and acts as an autocrine and paracrine growth factor for lung epithelial cells as well as lung cancer cells,

also nicotine and its derivatives activate nAChRs. Chronic nicotine exposure increases the expression of different types of nAChRs in lung cells, leading to increased stimulation of especially $\alpha 7$ -nAChRs by nicotine and physiological stimulation of cells by autocrine and paracrine ACh loops. Binding of an agonist (e.g. nicotine or ACh) to nAChRs leads to the increased intracellular concentration of Ca^{2+} ions and a cascade of different signaling pathways that result in the increased cell proliferation and migration, enhanced angiogenesis, and decreased apoptosis. Based on the findings of the role of nAChR agonists in the development and progression of lung cancer, research has been directed toward the use of nAChR antagonists, which prevent the stimulatory effects of nicotine and other nAChR agonists (including endogenous ones) and could be useful in cancer treatment. Furthermore, it was suggested that nAChR antagonists could induce apoptosis in some cases. So far they were mostly used as blocking agents for studying signalling pathways mediated by agonist binding. However, little is known about signalling pathways mediated by antagonist binding themselves. Moreover, the effects of nAChR antagonists on non-cancer cells can cause a number of side effects. Therefore, it is important to ensure that the antagonist acts predominantly on cancer cells, what can be achieved by nanodelivery systems that allow targeted drug delivery. Advances in nanotechnology are opening new opportunities for the use of nanoparticles as drug delivery systems in cancer cells, enabling the development of more effective and safer drugs for cancer treatment. The use of nanoparticles as drug carriers provides us with the ability to protect the drug from degradation, control and prolong drug release, achieve better and more controlled penetration of tissues and cells, incorporate multiple different active and supplementary compounds into the same nanoparticle, and achieve targeted drug delivery. Research that provides new insights into the mechanisms and pathways of lung cancer development, explorations of compounds that inhibit or stop these pathways, and testing of new drug delivery systems are critical to developing new and better approaches to treat this disease.

Zahvala

Prispevek je del podoktorskega projekta z naslovom Nanodostavni sistemi antagonistov nAChR za razvoj nove strategije zdravljenja raka pljuč (Z1-2634), ki ga vodi Veno Kononenko in je

financiran s strani javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS). Prispevek je ARRS podprla tudi s financiranjem programa P1-0207, projekta J1-9162 in s financiranjem mlade raziskovalke 1000-19-0106.

Literatura

- Anderson, C.F., Grimmett, M.E., Domalewski, C.J., Cui, H., 2020. Inhalable nanotherapeutics to improve treatment efficacy for common lung diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12 (1), e1586.
- Anselmo, A.C., Mitragotri, S., 2019. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & Translational Medicine*, 4 (3), e10143.
- Berne, S., Čemažar, M., Frangež, R., Juntos, P., Kranjc, S., Grandič, M., Savarin, M., Turk, T., 2018. APS8 Delays Tumor Growth in Mice by Inducing Apoptosis of Lung Adenocarcinoma Cells Expressing High Number of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors. *Marine Drugs*, 16 (10), 367.
- Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33 (9), 941.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (6), 394–424.
- Calles, A., Aguado, G., Sandoval, C., Álvarez, R., 2019. The role of immunotherapy in small cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 21 (8), 961–976.
- Carr, L.L., Jacobson, S., Lynch, D.A., Foreman, M.G., Flanagan, E.L., Hersh, C.P., Sciurba, F.C., Wilson, D.O., Sieren, J.C., Mulhall, P., Kim, V., 2018. Features of COPD as predictors of lung cancer. *Chest*, 153 (6), 1326–1335.
- Cattaneo, M.G., Codignola, A., Vicentini, L.M., Clementi, F., Sher, E., 1993. Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Research*, 53 (22), 5566–5568.
- Chen, J., Cheuk, I.W., Shin, V.Y., Kwong, A., 2019. Acetylcholine receptors: key players in cancer development. *Surgical Oncology*, 31, 46–53.
- Chernyavsky, A.I., Shchepotin, I.B., Galitovkiy, V., Grando, S.A., 2015. Mechanisms of tumor-promoting activities of nicotine in lung cancer: synergistic effects of cell membrane and mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors. *BMC Cancer*, 15 (1), 152.
- Cho, K., Wang, X.U., Nie, S., Shin, D.M., 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14 (5), 1310–1316.
- Dasgupta, P., Kinkade, R., Joshi, B., DeCook, C., Haura, E., Chellappan, S., 2006. Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (16), 6332–6337.
- Doroshov, D.B., Sanmamed, M.F., Hastings, K., Politi, K., Rimm, D.L., Chen, L., Ignacio, M., Kurt, A.S., Herbst, R.S., 2019. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: facts and hopes. *Clinical Cancer Research*, 25 (15), 4592–4602.
- Doroudian, M., Azhdari, M.H., Goodarzi, N., O'Sullivan, D., Donnelly, S.C., 2021. Smart Nanotherapeutics and Lung Cancer. *Pharmaceutics*, 13 (11), 1972.
- El-Bayoumy, K., Stoner, G., 2022. Use of Freeze-dried Watercress for Detoxification of Carcinogens and Toxicants in Smokers: Implications of the Findings and Potential Opportunities. *Cancer Prevention Research*, 15 (3), 139–141.
- Ferchmin, P.A., Pagán, O.R., Ulrich, H., Szeto, A.C., Hann, R.M., Eterović, V.A., 2009. Actions of oc-

- tocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 54 (8), 1174–1182.
- Friedman, J.R., Richbart, S.D., Merritt, J.C., Brown, K.C., Nolan, N.A., Akers, A.T., Lau, J.K., Robateau, Z.R., Miles, S.L., Dasgupta, P., 2019. Acetylcholine signaling system in progression of lung cancers. *Pharmacology and Therapeutics*, 194, 222–254.
- Grando, S.A., 2014. Connections of nicotine to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14 (6), 419–429.
- Grozio, A., Palarci, L., Catassi, A., Servent, D., Cilli, M., Piccardi, F., Paganuzzi, M., Cesario, A., Granone, P., Mourier, G., Russo, P., 2008. Natural agents targeting the $\alpha 7$ -nicotinic-receptor in NSCLC: A promising prospective in anti-cancer drug development. *International Journal of Cancer*, 122 (8), 1911–1915.
- Haywood, A.J., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Bergquist, P.R., Bergquist, P.L., Adamson, J., Mackenzie, L., 2004. Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus *karenia* (dinophyceae) from New Zealand. *Journal of Phycology*, 40, 165–179.
- Houssen, W.E., Lu, Z., Edrada-Ebel, R., Chatzi, C., Tucker, S.J., Sepčić, K., Turk, T., Zovko, A., Shen, S., Mancini, I., Scott, R.H., 2010. Chemical synthesis and biological activities of 3-alkyl pyridinium polymeric analogues of marine toxins. *Journal of Chemical Biology*, 3 (3), 113–125.
- Hu, T., Burton, I.W., Cembella, A.D., Curtis, J.M., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L., 2001. Characterization of spirolides a, c, and 13-desmethyl c, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *Journal of Natural Products*, 64 (3), 308–312.
- Hurst, R., Rollema, H., Bertrand, D., 2013. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 137 (1), 22–54.
- Imani, R., Dillert, R., Bahnemann, D.W., Pazoki, M., Apih, T., Kononenko, V., Repar, N., Kralj-Iglič, V., Boschloo, G., Drobne, D., Edvinsson, T., 2017. Multifunctional Gadolinium-Doped Mesoporous TiO_2 Nanobeads: Photoluminescence, Enhanced Spin Relaxation, and Reactive Oxygen Species Photogeneration, Beneficial for Cancer Diagnosis and Treatment. *Small*, 13 (20), 1700349.
- Jennings, K.R., Brown, D.G., Wright, D.P., 1986. Methyllycaconitine, a naturally occurring insecticide with a high affinity for the insect cholinergic receptor. *Experientia*, 42, 611–613.
- Jull, B., Plummer III, H.K., Schuller, H., 2001. Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco-specific nitrosamine NNK of a Raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127 (12), 707–717.
- Kawai, H., Berg, D.K., 2001. Nicotinic acetylcholine receptors containing the $\alpha 7$ subunits on rat cortical neurons do not undergo long lasting inactivation even when upregulated by chronic nicotine exposure. *Journal of Neurochemistry*, 78 (6), 1367–1378.
- Kononenko, V., Narat, M., Drobne, D., 2015. Nanoparticle interaction with the immune system. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 66 (2), 97–108.
- Kononenko, V., Erman, A., Petan, T., Križaj, I., Kralj, S., Makovec, D., Drobne, D., 2017a. Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO_2 -SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells. *Nanotoxicology*, 11 (3), 419–429.
- Kononenko, V., Imani, R., Repar, N., Benčina, M., Lorenzetti, M., Erman, A., Drobne, D., Iglič, A., 2017b. Phototoxicity of Mesoporous TiO_2 Gd Microbeads With Theranostic Potential. In: *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, Academic Press, 26, 153–171.
- Koss, D.J., Hindley, K.P., David, K.C., Mancini, I., Guella, G., Sepčić, K., Turk, T., Rebolj, K., Riedel, G., Platt, B., Scott, R.H., 2007. A comparative study of the actions of alkylpyridinium salts from a marine sponge and related synthetic compounds in rat cultured hippocampal neurones. *BMC Pharmacology*, 7 (1), 1.
- Liu, Q., Yu, K.W., Chang, Y.C., Lukas, R.J., Wu, J., 2008. Agonist-induced hump current production in heterologously-expressed human $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29 (3), 305–319.

- Lucky, S.S., Soo, K.C., Zhang, Y., 2015. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Reviews*, 115 (4), 1990–2042.
- Maneckjee, R., Minna, J.D., 1990. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (9), 3294–3298.
- Mao, Y., Yang, D., He, J., Krasna, M.J., 2016. Epidemiology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 25 (3), 439–445.
- Marques, P., Piqueras, L., Sanz, M.J., 2021. An updated overview of e-cigarette impact on human health. *Respiratory Research*, 22, 1–14.
- Mucchiello, V., Crespi, A., Fasoli, F., Clementi, F., Gotti, C., 2016. Neuronal acetylcholine nicotinic receptors as new targets for lung cancer treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 22 (14), 2160–2169.
- Mucchiello, V., Fasoli, F., Pucci, S., Moretti, M., Benfante, R., Maroli, A., Di Lascio, S., Bolchi, C., Pallavicini, M., Dowell, C., McIntosh, M., 2018. $\alpha 9$ - and $\alpha 7$ -containing receptors mediate the pro-proliferative effects of nicotine in the A549 adenocarcinoma cell line. *British Journal of Pharmacology*, 175 (11), 1957–1972.
- Murthy, S.K., 2007. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *International Journal of Nanomedicine*, 2 (2), 129.
- Onkološki inštitut Ljubljana, Rak pljuč, <https://www.onko-i.si/za-javnost-in-bolnike/vrste-raka/rak-pljuc> (4. 4. 2022)
- Paleari, L., Negri, E., Catassi, A., Cilli, M., Servent, D., D'Angelillo, R., Cesario, A., Russo, P., Fini, M., 2009a. Inhibition of nonneuronal $\alpha 7$ -nicotinic receptor for lung cancer treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179 (12), 1141–1150.
- Paleari, L., Cesario, A., Fini, M., Russo, P., 2009b. Foundation review: $\alpha 7$ -nicotinic receptor antagonists at the beginning of a clinical era for NSCLC and mesothelioma? *Drug Discovery Today*, 14, 822–836.
- Paranjpe, M., Müller-Goymann, C., 2014. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (4), 5852–5873.
- Picciotto, M.R., Kenny, P.J., 2021. Mechanisms of nicotine addiction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11 (5), a039610.
- Ren, J., Zhu, X., Xu, P., Li, R., Fu, Y., Dong, S., Zhangsun, D., Wu, Y., Luo, S., 2019. d-Amino Acid Substitution of α -Conotoxin RgIA Identifies its Critical Residues and Improves the Enzymatic Stability. *Marine Drugs*, 17 (3), 142.
- Riley, R.S., June, C.H., Langer, R., Mitchell, M.J., 2019. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature reviews Drug Discovery*, 18 (3), 175–196.
- Sadhukha, T., Wiedmann, T.S., Panyam, J., 2013. Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy. *Biomaterials*, 34 (21), 5163–5171.
- Samson, A.O., Levitt, M., 2008. Inhibition mechanism of the acetylcholine receptor by alpha-neurotoxins as revealed by normal-mode dynamics. *Biochemistry*, 47 (13), 4065–70.
- Sanner, T., Grimsrud, T.K., 2015. Nicotine: carcinogenicity and effects on response to cancer treatment—a review. *Frontiers in Oncology*, 5, 196.
- Schuller, H.M., 1989. Cell type specific, receptor-mediated modulation of growth kinetics in human lung cancer cell lines by nicotine and tobacco-related nitrosamines. *Biochemical Pharmacology*, 38 (20), 3439–3442.
- Schuller, H.M., 2007. Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. *Life sciences*, 80 (24-25), 2274–2280.
- Schuller, H.M., Al-Wadei, H.A., Majidi, M., 2008. Gammaaminobutyric acid, a potential tumor suppressor for small airway-derived lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 29 (10), 1979–1985.
- Schuller, H.M., 2009. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors?. *Nature Reviews Cancer*, 9 (3), 195.
- Schuller, H.M., 2019. The impact of smoking and the influence of other factors on lung cancer. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 13 (8), 761–769.

- Sepčić, K., Guella, G., Mancini, I., Pietra, F., Serra, M.D., Menestrina, G., Tubbs, K., Maček, P., Turk, T. (1997). Characterization of anticholinesterase-active 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai* in aqueous solutions. *Journal of Natural Products*, 60 (10), 991–996
- Shen, A.M., Minko, T., 2020. Pharmacokinetics of inhaled nanotherapeutics for pulmonary delivery. *Journal of Controlled Release*, 326, 222–244.
- Shiraishi, K., Kunitoh, H., Daigo, Y., Takahashi, A., Goto, K., Sakamoto, H., Ohnami, S., Shimada, Y., Ashikawa, K., Saito, A., Watanabe, S.I., 2012. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nature Genetics*, 44 (8), 900.
- Siemann, D.W., 2011. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by tumor-vascular disrupting agents. *Cancer Treatment Reviews*, 37 (1), 63–74.
- Skok, M., Gergalova, G., Lykhmus, O., Kalashnyk, O., Koval, L., Uspenska, K., 2016. Nicotinic acetylcholine receptors in mitochondria: subunit composition, function and signaling. *Neurotransmitter*, 3, e1290
- Thandra, K.C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J.S., Barsouk, A., 2021. Epidemiology of lung cancer. *Contemporary Oncology*, 25 (1), 45.
- Turk, T., Frangež, R., Sepčić, K., 2007. Mechanisms of toxicity of 3-alkylpyridinium polymers from marine sponge *Reniera sarai*. *Marine Drugs*, 5, 157–167.
- Turk, T., Sepčić, K., Mancini, I., Guella, G., 2008. 3-Akylpyridinium and 3-alkylpyridine compounds from marine sponges, their synthesis, biological activities and potential use. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, 35, 355–397.
- Utkin, Y.N., 2013. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom—milestones of discovery. *Toxicon*, 62, 50–55.
- Vulfius, C.A., Kasheverov, I.E., Starkov, V.G., Osipov, A.V., Andreeva, T.V., Filkin, S.Y., Gorbacheva, E.V., Astashev, M.E., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N., 2014. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a novel facet in the pleiotropic activities of snake venom phospholipases A2. *PloS One*, 9 (12), e115428.
- Wang, S., Hu, Y., 2018. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in lung cancer. *Oncology Letters*, 16 (2), 1375–1382.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*, 154 (8), 1558–1571.
- Whiteaker, P., Christensen, S., Yoshikami, D., Dowell, C., Watkins, M., Gulyas, J., Rivier, J., Olivera, B.M., McIntosh, J.M., 2007. Discovery, synthesis, and structure activity of a highly selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Biochemistry*, 46 (22), 6628–6638.
- Wintersteiner, O., Dutcher, J.D., 1943. Curare alkaloids from *Chondodendron tomentosum*. *Science*, 97, 467–470.
- Wittenberg, R.E., Wolfman, S.L., De Biasi, M., Dani, J.A., 2020. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology*, 177, 108256.
- Wolfram, J., Ferrari, M., 2019. Clinical cancer nanomedicine. *Nano Today*, 25, 85–98.
- Ye, D., Li, Y., Gu, N., 2018. Magnetic labeling of natural lipid encapsulations with iron-based nanoparticles. *Nano Research*, 11 (6), 2970–2991.
- Zhu, X., Pan, S., Xu, M., Zhang, L., Yu, J., Yu, J., Wu, Y., Fan, Y., Li, H., Kasheverov, I.E., Kudryavtsev, D.S., Tsetlin, V.I., Xue, Y., Zhangsun, D., Wang, X., Luo, S., 2020. High Selectivity of an α -Conotoxin LvIA Analogue for $\alpha 3\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Is Mediated by $\beta 2$ Functionally Important Residues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63 (22), 13656–13668.
- Zovko, A., Viktorsson, K., Lewensohn, R., Kološa, K., Filipič, M., Xing, H., Kem, W.R., Palcari, L., Turk, T., 2013. APS8, a polymeric alkylpyridinium salt blocks $\alpha 7$ nAChR and induces apoptosis in non-small cell lung carcinoma. *Marine Drugs*, 11 (7), 2574–2594.